

**Die quantitative Bestimmung
von Vitamin-A-Alkohol neben Vitamin-A-Estern
im Blut**

Helmut Alchele

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von Helmut Aichele

aus Stuttgart

Juni 1959

5349/60

II

Die quantitative Bestimmung
von Vitamin-A-Alkohol neben Vitamin-A-Estern
im Blut

L. Kollmannsperger, Prof. Dr. A. Scharrer

V. Baumgarten, Prof. Dr. E. Scharrer

Tag der öffentlichen Vorlesung: 24. Juli 1925

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1959.

1. *Antennaria dioica* (L.) A. N. S. P.
 2. *Antennaria dioica* (L.) A. N. S. P.
 3. *Antennaria dioica* (L.) A. N. S. P.

Frau Katharina Schiedt-Britt

zur Erinnerung an

Ulrich Schiedt

in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Meinem verehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt

danke ich herzlich für das nie erlahmende Interesse, das er
meiner Arbeit entgegenbrachte.

Herr Dr. E. Hecker hat mir in beispielhafter Weise gezeigt,
dass der Erfolg einer Arbeit gleichermassen von Idee und
Experimentierkunst abhängt.

Für seine vorbildliche Haltung werde ich ihm dankbar
bleiben.

Inhaltsangabe

	Seite
I. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	3
II. <u>Extraktion definierter Mengen von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Estern aus Blutplasma.</u>	6
a) Einbringen von Vitamin-A in Plasma	6
b) Fermentabbau der Proteine	7
c) Anwendung der Gefriertrocknung	8
d) Versuche mit Invertseife	8
e) Versuche mit Harnstoff	8
f) Denaturierung mit Salzen	9
III. <u>Die chromatographische Trennung von Vitamin-A-Alkohol und seinen Estern.</u>	10
1) Modellversuche mit reinem Vitamin-A	10
2) Chromatographie von Vitamin-A-haltigen Extrakten aus Blutplasma	15
a) Veresterung des Vitamin-A-Alkohols	16
b) Zerstörung des Vitamin-A durch ultraviolettes Licht	17

	Seite
3) Bestimmung der höheren Vitamin-A-Ester	20
4) Der Gang der Bestimmungsmethode	21
5) Nachweisempfindlichkeit der Bestimmungsmethode für Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte	22
IV. <u>Anwendungen der Bestimmungsmethode</u>	24
1) Stabilität von Vitamin-A in Plasma	24
2) Einfluß der Haemolyse auf den Vitamin-A-Gehalt von Plasma	25
3) Adsorption von Vitamin-A an Blutzellen	26
4) Belastungsversuche	27
V. <u>Versuche</u>	30

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.

Die moderne Medizin behandelt verschiedene Krankheitsbilder mit oralen Gaben von Vitamin-A. Der unbeständige und labile reine Vitamin-A-Alkohol verändert sich besonders schnell in sauerem Milieu und ist zur Applikation per os ungeeignet. Pharmazeutische Präparate enthalten deshalb die stabileren Vitamin-A-Ester, meist Vitamin-A-Acetat oder Vitamin-A-Palmitat. Als Vorstufe der Wirkformen des Vitamins gilt der Vitamin-A-Alkohol (1). Es sind auch Vitamin-A-Aldehyd und Vitamin-A-Säure (1, 2) aus Organen isoliert worden und Blutplasma enthält sowohl freies als auch verestertes Vitamin (3, 4).

Für das Problem der Resorption und des Wirkungsmechanismus des Vitamins ist es deshalb von Interesse festzustellen, in welcher Form als Ester appliziertes Vitamin-A im Blut auftritt. Dazu ist ein Verfahren auszuarbeiten, das es erlaubt, physiologische Mengen von Vitamin-A-Alkohol, Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat im Blut quantitativ nebeneinander zu bestimmen. Dazu müssen im wesentlichen drei methodische Voraussetzungen geschaffen werden, die von den gebräuchlichen, in der Literatur beschriebenen Bestimmungsmethoden nur teilweise erfüllt werden:

- a) Eine Methode zur Anreicherung der drei Komponenten aus Blut.
- b) Ein Verfahren zur quantitativen Trennung der drei Komponenten.
- c) Eine Mikrobestimmungsmethode, die noch Mengen $< 10^{-6}$ g von Vitamin-A-Alkohol, Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat zu erfassen gestattet.

-
- 1) G. WALD AM. J. OPHTHALMOL. 40, 18 (1955)
 - 2) I. E. DOWLING u. G. WALD Proceedings of the National Academy of Sciences 44, 648 (1958)
 - 3) S. W. CLAUSEN, W. S. BAUM, A. B. MC. COORD, I. O. RYDEN u. B. B. BREESE J. NUTRIT. 24, 1 (1942)
 - 4) J. GANGULY, N. J. KRINSKY, J. W. MEHL u. H. J. DEUEL JR. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 38, 275 (1952)

Zur Anreicherung von Vitamin-A und seinen Estern hat sich die Extraktion mit Lipoidlösungsmitteln als günstig erwiesen. Wegen der haemolytischen Eigenschaften dieser Lösungsmittel ist es aber erforderlich, die Erythrocyten aus dem Vollblut zu entfernen und die Vitamin-Bestimmung am Blutplasma auszuführen. Das im Haem gebundene zweiwertige Eisen (5) zerstört Vitamin-A. Sämtliche Vitamin-A-Bestimmungsmethoden gehen deshalb von Blutplasma aus.

Vor der Extraktion mit Lipoidlösungsmitteln muss das Plasma enteiwesst werden, wobei die Proteinfällungsmittel so zu wählen sind, dass einerseits Vitamin-A und seine Ester nicht angegriffen, sie andererseits aber auch aus vorhandenen Proteinsymplexen freigesetzt werden. Vielfach wird zur Enteiweissung Äthanol verwendet und der wässrige Überstand danach mit Äther oder Petroläther ausgezogen. Dabei werden allerdings auch eine Reihe unspezifisch absorbierender Stoffe mitextrahiert, wodurch die Werte bei der Messung im U. V. -Spektralphotometer zu hoch ausfallen können. Dies kann vermieden werden, wenn man das Plasma vor der Extraktion mit methanolischer Kalilauge verseift (6). Dabei kann auch ein Teil des Vitamins zerstört werden, wodurch man u. U. zu niedere Werte erhält (7).

Die Bestimmung des Vitamins-A und seiner Derivate kann prinzipiell auf der spezifischen U. V. -Absorption dieser Stoffklasse bei 324 mμ aufgebaut werden. Auch die gelbgrüne Fluoreszenz des Vitamins-A ist zu seiner Bestimmung ausgenützt worden, wobei Carotin, Kryptoxanthin und Vitamin-D nicht stören sollen (8, 9). Für klinische Routinebestimmungen wird am häufigsten die nach ihren Entdeckern benannte CARR-PRICE-Reaktion verwendet (10). Einfache Photometer genügen zur Messung des blauen Reaktionsprodukts zwischen Antimontri- und pentachlorid. Nachteilig ist die geringe Spezifität dieser Methode. Derivate des Ionons, Cholesterin und Carotinoide geben dieselbe Farbe, während ungesättigte Fettsäuren, Vitamin-A₂, Vitamin-D₃ und Sterine die Färbung verfälschen.

-
- 5) W. HEIMANN DTSCH. LEBENSM. RDSCH. 43, 35 (1947)
 - 6) VAN EEKELN, EMMERIE u. WOLF Z. VITAMINF. 6, 150 (1937)
 - 7) H. WILLSTAEDT Z. VITAMINF. 9, 212 (1939)
 - 8) H. SOBOTKA, S. KANN u. W. WINTERNITZ J. BIOL. CHEM. 152, 635 (1944)
 - 9) A. FUJITA u. M. AOYAMA VITAMINS JAPAN 4, 15 (1951)
 - 10) F. H. CARR u. E. A. PRICE BIOCHEM. J. 20, 497 (1926)

Die Messung muss unter Ausschluss von Wasser durchgeführt werden. In neuerer Zeit wird daher der Farbreaktion mit dem Glycerin- 1, 3- Dichlorhydrin (11), die durch geringe Mengen von Wasser nicht gestört wird, der Vorzug gegeben. Sie ist aber nur halb so empfindlich wie die CARR-PRICE-Reaktion.

Im klinischen Laboratorium begnügt man sich im allgemeinen mit der Bestimmung des Gesamtvitamins-A als Vitamin-A-Alkohol und umgeht auf diese Weise die Trennung des Alkohols von den Estern. Wenn Vitamin-A-Alkohol und die Ester nebeneinander bestimmt werden sollen, ist die Auftrennung des Extrakts aus Blutplasma unumgänglich. In der Literatur wird dazu die Anwendung der Absorptionschromatographie mit Natrium-Aluminium-Silikat (12), Calciumchlorid oder Knochenmehl (13) sowie Aluminiumoxyd verschiedener Aktivitäten (14) empfohlen. Allen diesen Verfahren haftet der Nachteil an, daß sie zwar den Vitamin-A-Alkohol von seinen Estern zu trennen gestatten, nicht aber die Ester untereinander.

Dies gelingt bei papierchromatographischer Trennung des Extrakts (15), jedoch ist zur nachfolgenden quantitativen Bestimmung der Komponenten ihre Elution vom Papier erforderlich. Ausserdem sind die hochempfindlichen Substanzen dabei auf großer Oberfläche dem Luftsauerstoff längere Zeit ausgesetzt. Es erscheint deshalb günstiger, zur Lösung des vorliegenden Trennungsproblems die Verteilungschromatographie auf einer Säule mit geeignetem Trägermaterial heranzuziehen.

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Bestimmungsmethode auszuarbeiten, die es gestattet, physiologische Mengen von Vitamin-A-Alkohol und seinen Estern nebeneinander in reproduzierbarer Weise quantitativ zu bestimmen. In Anwendung der Methode soll der Gehalt menschlichen Blutplasmas an den drei Komponenten Vitamin-A-Alkohol, Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat in einigen Beispielen untersucht werden.

11) A. E. SOBEL u. H. WERBIN J. BIOL. CHEM. 159, 681 (1945)

12) C. D. ROBESON u. I. G. BAXTER J. AM. CHEM. SOC. 69, 136 (1947)

13) I. GLOVER u. R. A. MORTON BIOCHEM. J. 41, 94 (1947)

14) P. B. MÜLLER HELV. CHIM. ACTA 26, 1945 (1943)

15) S. P. DATTA BIOCHEM. J. 44, XLIII (1949)

II. Extraktion definierter Mengen von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Estern aus Blutplasma.

a) Einbringen von Vitamin-A in Blutplasma.

Die Zuverlässigkeit einer Extraktionsmethode zur Gewinnung von Vitamin-A-Alkohol und seinen Estern aus Blutplasma lässt sich kontrollieren, wenn genau bekannte Mengen dieser Verbindungen im Plasma enthalten sind. Es war daher zunächst eine Methode auszuarbeiten, die das Einbringen gemessener Mengen von Vitamin-A in Plasma gestattet, ohne dessen physiologischen Zustand wesentlich zu ändern. Zu den Versuchen wurde, wenn nicht anders erwähnt, immer Rinderplasma verwendet.

Naturgemäss kann man nicht ohne weiteres erwarten, dass dem Plasma in vitro zugefügtes Vitamin-A sich in demselben Solvatationszustand befindet wie in vivo appliziertes Vitamin-A. Trotzdem erwies sich in vitro angereichertes Plasma im Verlauf dieser Arbeit als wertvolles Kontrollobjekt für die ausgearbeiteten Methoden.

Das Einbringen von Vitamin-A in methanolischer Lösung erwies sich als ungeeignet, weil dabei ein Teil der Plasmaproteine ausflockt und Vitamin-A und seine Ester möglicherweise einschliesst. Auch Versuche, kristallines Vitamin-A dem Plasma direkt zuzusetzen, scheiterten an der zu geringen Löslichkeit des Vitamins, während wässrige Lösungen des Vitamins mit Gelatine als Lösungsvermittler wegen der hohen Eigenabsorption der Gelatine bei 324 m μ nicht auf ihren Vitamingehalt kontrolliert werden konnten.

Andererseits ist bekannt, dass sich Äther in grossen Mengen reversibel im Blut löst. Tatsächlich gelingt es im in vitro-Versuch, 1 ml Diäthyläther in 5 ml Plasma einzubringen, ohne dass eine sichtbare Veränderung auftritt. Auf ähnliche Weise gelingt es auch, dem Plasma definierte Vitamin-A-Mengen zuzusetzen, wenn man wie folgt verfährt:

Nach Zentrifugieren von frischem Rinderblut gibt man zum überstehenden Plasma unter Rühren eine ätherische Lösung von Vitamin-A bekannten Gehalts. Danach wird so lange Stickstoff auf die Oberfläche des ständig gerührten Plasmas geblasen, bis der Äther verdampft ist. Die Präparation ist gelungen, wenn sich das Plasma gegenüber einer unbehandelten Probe hinsichtlich Färbung und Trübung nicht verändert hat. Zur Messung des aufgenommenen Vitamins entnimmt man

dem Präparat 1 ml, verdünnt mit Tyrodelösung, zentrifugiert bei 2500 U / min und misst bei 324 m μ gegen unbehandeltes Plasma, das in derselben Weise verdünnt wurde. Etwa 40 Versuche zeigen, dass nur etwa 83% des zugefügten Vitamin-A-Alkohols im Plasma spektrophotometrisch nachzuweisen ist (Versuch 1 mit Tabelle 8).

Arithmetisches Mittel aus 40 Versuchen

$$M=83\%$$

Mittlerer Fehler der Einzelmessung

$$f_m = \pm 13$$

Der Rest wird vermutlich während des Einbringens durch Sauerstoff zerstört.

Vitamin-A und seine Ester lassen sich aus Plasma nicht ohne weiteres extrahieren; beide Formen des Vitamins liegen im Plasma an Proteinfractionen gebunden vor. I. L. ONCLEY et al. (16) nehmen eine Bindung des Vitamin-A-Alkohols an Proteine mit einer Dichte grösser als 1, 21 und der Vitamin-A-Ester an Lipoproteine an, während M. S. PEISACH et al. (17) die Bindung des Vitamin-A-Alkohols an α_1 -Globuline diskutieren. Eine quantitative Extraktion ist also nur gewährleistet, wenn diese Symplexe das Vitamin freigeben.

b) Fermentabbau.

Es liegt nahe, den Abbau der Proteinsymplexe und die Enteiweissung durch Incubieren des Plasmas mit Proteasen vorzunehmen. Verwendet wurden Trypsin, Pankreaslipase und ein Pilzferment aus *Aspergillus orycae*. Die Methodik war in allen Fällen gleich: Rinderplasma, dem Vitamin-A-Stearat zugesetzt war, wurde mit Natronlauge denaturiert und mit Essigsäure auf p_H 7 eingestellt.

16) N. J. KRINSKY, D. G. CORNWELL u. I. L. ONCLEY
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 73, 233 (1958)

17) C. F. GARBERS, J. GILLMANN u. M. S. PEISACH NATURE 182, 1018
(1958)

Das Plasmaeiweiss wurde mit der Fermentlösung bei 37°C 1-24 Stunden incubiert und die incubierte Lösung mit Methanol/Äther extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde die Extinktion des Trockenrückstands bei 324 m μ gemessen. Das Extinktionsmaximum des Vitamin-A war in allen Fällen durch mit-extrahierte Substanzen stark überlagert. Eine zuverlässige Bestimmung kann daher auf dieser Methode nicht aufgebaut werden.

c) Anwendung der Gefriertrocknung.

Lipoproteine werden durch Einfrieren zerstört, während Albumine und β -Globulin unbeeinflusst bleiben (18). An Lipoproteine gebundenes Vitamin-A müsste also frei werden und aus dem Trockenpulver zu extrahieren sein. In unseren Versuchen wurden aber im besten Fall nur 20% des zugesetzten Vitamin-A-Stearats zurück-erhalten.

d) Versuch mit Invertseife.

Auch die Anwendung der Invertseife Zephirol zur Proteinfällung brachte keine Verbesserung der Vitamin-A-Ausbeute. Bei Zusatz grösserer Mengen von Invert-seife koagulierte das Plasmaeiweiss, was die quantitative Extraktion mit Lösungsmitteln unmöglich machte.

e) Versuche mit Harnstoff.

Harnstoff ist als Wasserstoffbrücken-lösendes Agens bekannt (19). In manchen Fällen gelingt es, damit auch Symplexe zu spalten. Es wurde daher versucht, durch Sättigung des Plasmas mit Harnstoff den Vitamin-A-Eiweisskomplex aufzuspalten. Nach der Extraktion machten mitextrahierte Fremdstoffe die Messung unmöglich. Um diese zu entfernen, wurde der Trockenrückstand, den man nach Äthanol/Äther-Extraktion erhielt, in Chloroform oder Benzol gelöst und auf eine Harnstoffsäule gegeben. Nach Durchwaschen mit Benzol/Äther 1:1 blieben die störenden Substanzen an der Säule haften, doch nur 25% des zugesetzten Vitamins konnten zu-rück-erhalten werden.

18) THE PROTEINS ACADEMIC PRESS INC. VOL. 2 PART B, 704 (1954)

19) ebendort

1094 (1954)

f) Denaturierung mit Salzen

Bessere Resultate brachte die Denaturierung des Plasmaeiweisses mit wasserfreien Salzen. Um zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen, wurde folgende Versuchsanordnung eingehalten:

Das wasserfreie Salz wird als Bodenkörper mit dem Extraktionsmittel, einem Gemisch aus Methanol / peroxydfreiem Äther 1:5 überschichtet und mit Eiswasser gekühlt. Dann gibt man das Vitamin-A-haltige Plasma unter Umschwenken tropfenweise zu und rührt so lange mit dem Glasstab, bis der zunächst zähe halb flüssige Bodenkörper pulvrig erscheint. Extrahiertes Carotin färbt das überstehende Lösungsmittelgemisch rasch gelb. Nach Digerieren des Bodenkörpers mit frischem Methanol / Äther 1 : 5 werden die Überstände vereinigt und zur Trockne gebracht. Der Trockenrückstand wird in Äthanol aufgenommen und die Ausbeute durch Messung der Extinktionen zwischen 300 und 350 $m\mu$ bestimmt (Versuch 2).

Tabelle 1

Extraktion von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Stearat mit Methanol/Äther 1:5 aus Plasma in Gegenwart wasserfreier Metallsalze. Weitere Erläuterungen im Text.

Plasma ml	Bodenkörper	Ausbeuten aus Extinktion bei 324 m in %	
		Vit. -A-Alkohol	Vit. -A-Stearat
5	MgSO ₄	74	80
5	Na ₂ SO ₄	68	77
5	CaSO ₄	75	60 - 70
5	HgSO ₄	-	-
5	ZnSO ₄	87 - 90	92 - 93

Wie man Tabelle 1 entnehmen kann, liefert die Anwendung von wasserfreiem Zinksulfat als Proteinfällungsmittel die höchsten Ausbeuten gemessen an der Extinktion der Extrakte bei 324 $m\mu$. Sie liegen im Vergleich zu den auf S. 7 angegebenen Mittelwerten für Vitamin-A-Alkohol um 5-10% zu hoch. Dies ist auf einen geringen Anteil mitextrahierten, unspezifischen Materials - wahrscheinlich Proteine zurückzuführen.

Erhöht man unter sonst gleichen Bedingungen den Anteil von Methanol am Extraktionsmittel oder unterlässt man die Eiskühlung, so wird Protein vermehrt extrahiert. (Versuch 3, Tabelle 9)

Auch das Waschen der Extrakte mit Wasser und die Temperatur beim Eindampfen beeinflussen die Extinktion der Extrakte (Versuch 3, Abb. 5). Die optimalen Bedingungen, unter denen die Extraktion vorgenommen wird, sind daher als Standardbedingungen anzusehen und exakt einzuhalten (Versuch 4).

III. Die chromatographische Trennung von Vitamin-A-Alkohol und seinen Estern.

Wie bereits einleitend ausgeführt wurde, können die Ester des Vitamins-A nicht durch Adsorptionschromatographie getrennt werden. Ein höheres Auflösungsvermögen hat im allgemeinen die Verteilungschromatographie, wenn auch meist die Kapazität der Säulen recht klein ist. Da hier ein Mikroverfahren ausgearbeitet werden soll, fällt dieser Nachteil gegenüber der hohen Trennschärfe nicht ins Gewicht. Es wurde versucht, ein verteilungschromatographisches System zu entwickeln^{†)}, das den hier zu stellenden Anforderungen genügt. Zweckmässig wendet man dazu die Arbeitsweise mit umgekehrten Phasen an, mit der auch bei andern stark lipophilen Substanzen Erfolge erzielt wurden.

1.) Modellversuche mit reinem Vitamin-A.

Die Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen setzt ein Trägermaterial voraus, das die zu verwendende Kohlenwasserstoffphase wesentlich stärker festhält als das zur Elution verwendete hydrophilere Lösungsmittel. Zu diesem Zweck ist von HOWARD und MARTIN (20) mit Dimethyl-dichlorsilan hydrophobisierte Kieselgur vorgeschlagen und bei der Trennung von höheren Fettsäuren mit Erfolg angewandt worden. Auch andere hydrophobe Trägermaterialien sind später zur Anwendung gelangt (21), doch scheinen sie auf die Trennwirkung keinen entscheidenden Einfluss zu haben (Versuch 5). Es wurde daher hydrophober Kieselgur der Vorzug gegeben.

Um festzustellen, welche Lösungsmittelkombination für die Trennung geeignet ist, wurden die Verteilungskoeffizienten

^{†)} Die ersten Versuche dazu sind von U. SCHIEDT am Max-Planck-Institut für Biochemie ausgeführt worden.

20) G. A. HOWARD u. A. J. P. MARTIN BIOCHEM. J. 46, 532 (1950)

21) O. WISS u. U. GLOOR HOPPE-SEYLER 310, 260 (1958)

$$K = \frac{c_1}{c_2}$$

(wobei c_1 =Konzentration in der unpolaren Phase

c_2 =Konzentration in der polaren Phase ist)

für verschiedene Vitamin-A-Abkömmlinge und β -Carotin in einigen Systemen U. V. -spektrophotometrisch ermittelt. In Tabelle 2 sind die erhaltenen Werte aufgeführt.

Tabelle 2.

Verteilungskoeffizienten K und Trennfaktoren β
von Vitamin-A-Alkohol, Vitamin-A-Acetat,
Vitamin-A-Stearat und β -Carotin bei 18-22°C.

Systeme

	n-Hexan- 92% Meth.	n-Hexan- 99, 5% Meth.	n-Heptan- 97% Meth.	n-Heptan- 97, 5% Meth.	n-Decan- 97, 5% Meth.
	K β	K β	K β	K β	K β
Vit-A-Alk. 2, 7		0, 4	0, 6	0, 6	0, 4
	3	3, 8	7, 2	4, 8	12, 4
Vit-A-Ac. 8, 1		1, 6	3, 8	2, 9	5, 0
		4, 5	13, 9	10, 0	14, 0
Vit-A-Stear.		7, 5	53, 6	29, 1	71, 5
		1, 0			
β -Carotin		7, 3			

Man kann aus Tabelle 2 entnehmen, dass

1.) Steigender Wassergehalt der mobilen Methanolphase

die "Trennfaktoren" $\beta = \frac{K_A}{K_B}$ erhöht, wobei K_A der Verteilungskoeffizient

der Substanz A mit dem höheren, K_B der Verteilungskoeffizient der Substanz B mit dem niedrigeren Verteilungskoeffizienten ist. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der bekannten Regel (22).

2.) der Übergang zu längerkettigen Paraffinen als stationäre Phase sich in der gleichen Richtung auswirkt wie Wasserzusatz zur mobilen Phase.

Ausser möglichst grossen Trennfaktoren soll das zur Anwendung gelangende Lösungsmittelsystem auch eine genügende Kapazität aufweisen. Diese muss mindestens so gross sein, dass die durchgesetzten Substanzmengen durch U. V. -messung noch exakt erfasst werden können. Bei den in Tabelle 2 angegebenen Systemen ist ebenfalls in Übereinstimmung mit der Regel die Kapazität umso kleiner, je grösser die Trennfaktoren in der verwendeten Lösungsmittelkombination sind.

Das Retentionsvolumen einer Substanz ist umso kleiner, je kleiner der Verteilungskoeffizient ist. Nach Tabelle 2 ist zu erwarten, dass Vitamin-A-Alkohol die Säule vor Vitamin-A-Acetat und dieses wiederum vor Vitamin-A-Palmitat verlässt. Für die Trennung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat wurde das im Hinblick auf Trennfaktoren, Lösungskapazität und Verteilungskoeffizienten in der Mitte liegende System

n-Heptan-97%-Methanol

gewählt (Versuch 5 und Tabellen 10 und 11). Der Verteilungskoeffizient des Vitamin-A-Stearats ist so gross (vgl. Tabelle 2), dass das Retentionsvolumen mit der verwendeten mobilen Phase sehr gross, d.h. die Elutionszeit sehr lange wird.

Bei der Chromatographie von reinem Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat zeigt es sich, dass die U. V. -Messung durch Substanzen, die aus der Kieselgur-Säule stammen, gestört wird.

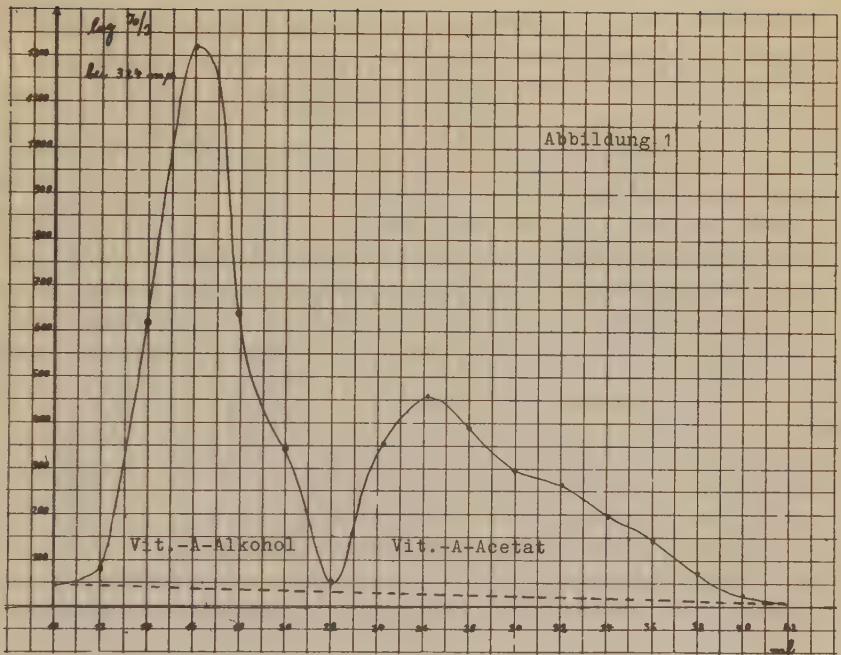


Abbildung 1.

Trennung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat ohne vorhergehende Reinigung des Trägermaterials. Der Untergrund ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Dieser unspezifische Untergrund kann dadurch beseitigt werden, daß die mit Dichlor-dimethylsilan hydrophobierte Kieselgur 7 Stunden lang im Soxhlet-Extraktionsapparat mit Heptan/Methanol extrahiert wird. Nach der Extraktion gibt die Kieselgur während der Chromatographie keine störenden Substanzen mehr an die Extraktionslösung ab (Abbildung 2).

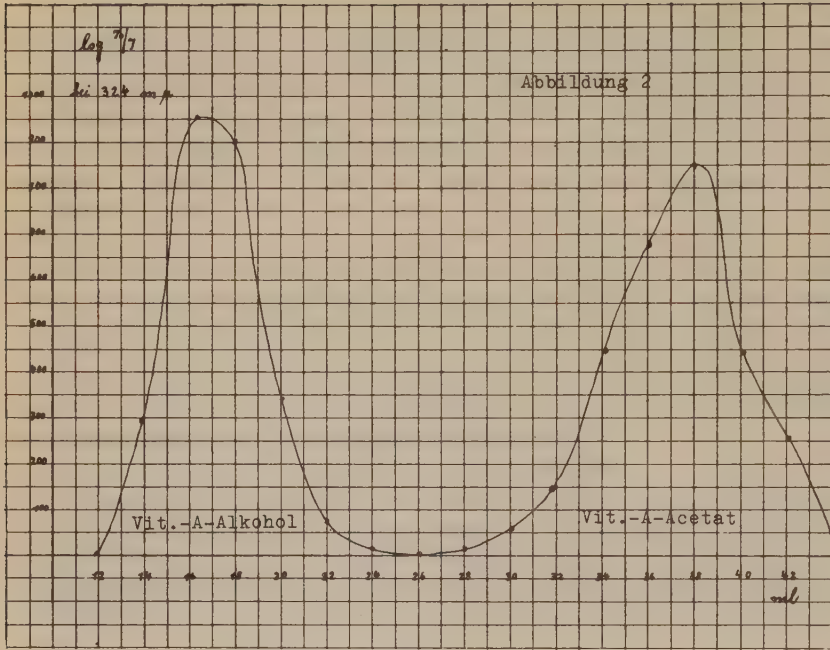


Abbildung 2.

Trennung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat
im System Heptan/Methanol an vorextrahierter Kieselgur.

Das auf die Säule gebrachte Vitamin wird nach der Chromatographie quantitativ zurückerhalten (Tabelle 10). Unter den gewählten Versuchsbedingungen ändert sich auch das bei verschiedenen Wellenlängen gemessene Verhältnis der Extinktionen des Vitamins-A nicht. Dies zeigt, dass das Vitamin-A unverändert zurückgewonnen wird (Tabelle 11). Die Durchlaufgeschwindigkeit ist von der Korngröße der verwendeten Kieselgur abhängig. Von den untersuchten Präparaten "Kieselgur Merck", "Celite 535" und "Hyflo Super Cel" zeichnet sich die Celite-Säule durch sehr gute Trennfähigkeit bei guter Durchlaufgeschwindigkeit aus;

es wird deshalb im folgenden immer mit dieser Kieselgur gearbeitet. Das Retentionsvolumen der beiden Banden ist bei Verwendung einer gleichbleibenden Menge Kieselgur innerhalb des Temperaturbereichs von 18-22°C konstant, nämlich Vitamin-A-Alkohol 16,5 ml und Vitamin-A-Acetat 38 ml (vgl. Abbildung 2).

2.) Chromatographie von Extrakten aus Blutplasma.

Nach Eindampfen eines Vitamin-A-haltigen Extrakts aus Blutplasma in einem Eindampfkölbchen bilden mitextrahierte Proteine auf der Kölbcheninnenfläche einen dünnen zähen Film, der möglicherweise Vitamin-A einschliesst. Dies kann aber vermieden werden, wenn man der Extraktionslösung, ehe sie im Umlaufverdampfer zur Trockne gebracht wird, etwas hydrophobisierte Kieselgur zugeibt. Beim Eindampfen setzt sich der Rückstand an der Kieselgur fest. Diese wird anschliessend mit mobiler Phase auf die Celite-Säule gegeben und der Chromatographie unterworfen.

Die beiden ersten Fraktionen der Vitamin-A-Alkohol-Bande enthalten Verunreinigungen, die das Maximum bei 324 m μ überlagern, wie man durch Messung der U. V. -Absorption zwischen 300 und 350 m μ feststellt. Alle folgenden Vitamin-A-Alkohol-Fraktionen und die ganze Vitamin-A-Acetat-Bande sind optisch rein. Im Rinderblut reichlich vorhandenes β -Carotin bleibt als scharfe gelbe Zone am Kopf der Säule hängen.

Der nicht ganz reine Vitamin-A-Alkohol könnte durch Überführung in Derivate von den vorauslaufenden Verunreinigungen befreit werden. Aussichtsreich ist die Überführung des Vitamin-A-Alkohols in Vitamin-A-Acetat oder den 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester. Ester der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4) haben sich als Derivate von gesättigten und ungesättigten Alkoholen gut bewährt (23-27).

23) E. HECKER CHEMISCHE BERICHTE 88, 1666 (1955)

24) A. BUTENANDT u. H. REMBOLD HOPPE-SEYLER 308, 284 (1957)

25) A. BUTENANDT u. NGUYEN-DANG TAM HOPPE-SEYLER 308, 277 (1957)

26) A. BUTENANDT, R. BECKMANN, D. STAMM u. E. HECKER,
Z. NATURFORSCHG. 14 b, 283 (1959)

27) F. LYNEN u. MITARB. ANGEW. CHEMIE 70, 738 (1958)

a) Veresterung des Vitamin-A-Alkohols.

Reiner Vitamin-A-Alkohol wird mit Acetanhydrid und Natriumacetat verestert. Danach lassen sich Verunreinigungen, die der Vitamin-A-Acetat-Bande vorauslaufen, durch Verteilungschromatographie abtrennen. Auf diese Weise kann der Vitamin-A-Alkohol als Vitamin-A-Acetat in optisch reiner Form erhalten werden. Nach einer Veresterungsdauer von 48 Stunden sind 70% des Alkohols in das Acetat übergeführt. Kürzere Veresterungszeiten verschlechtern die Ausbeute (vgl. Versuch 6, Tabelle 12).

Der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Vitamin-A-Alkohols ist noch nicht beschrieben worden. Vitamin-A-Alkohol wird mit 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid und Pyridin in Benzol zur Reaktion gebracht. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton erhält man den reinen Vitamin-A-Ester (Versuch 7). Die U. V.-Spektren des Esters und verwandter Verbindungen sind in Abbildung 3 wiedergegeben.

Schmelzpunkte einiger Vitamin-A-Derivate (28, 29)

Palmitat	28-29°C
Methyläther	34-35°C
Acetat	57-58°C
β-Napththoesäure-ester	74-75°C
p-Phenyl-azobenzoesäure-ester	79-80°C
Anthrachinon-β-carbonsäure-ester	122-123°C
4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester	142-143°C

28) O. ISLER, W. HUBER, A. RONCO u. M. KOFLER

HELV. CHIM. ACTA 30, 1911 (1947)

29) O. ISLER, A. RONCO, W. GUERX, N. C. HINDLEY, W. HUBER, K. DIALER u.

M. KOFLER HELV. CHIM. ACTA 32, 489 (1949)

Abbildung 3.

U. V. Spektrum des Vitamin-A-Acetats (1), des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Vitamin-A-Alkohols (2) und des 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Sorbinols[†] (3).

Zur weiteren Charakterisierung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters werden verschiedene papierchromatographische Systeme auf ihre Brauchbarkeit hinsichtlich befriedigender R_f -Werte und Laufzeiten untersucht. Versuche mit imprägniertem Papier (Schleicher-Schüll Nr. 2043 b mit Stearato-chrom-(3)-chlorid-Imprägnierung) und den Systemen Octan-Nitromethan, Decan-Nitromethan, Heptan-Methanol, Heptan-97% Methanol, Octan-Methanol und Octan-97% Methanol führen nur mit dem System Octan-97% Methanol zu einem befriedigenden R_f -Wert bei 5 Stunden Laufzeit. Bessere Ergebnisse liefert acetyliertes Papier (Schleicher-Schüll Nr. 2043 b) mit einem Pyridin/Decan-System. Unter Einhaltung der Versuchsbedingungen erhält man einen R_f -Wert von 0,53 bei 6 Stunden Laufzeit (Versuch 8, Tab.13).

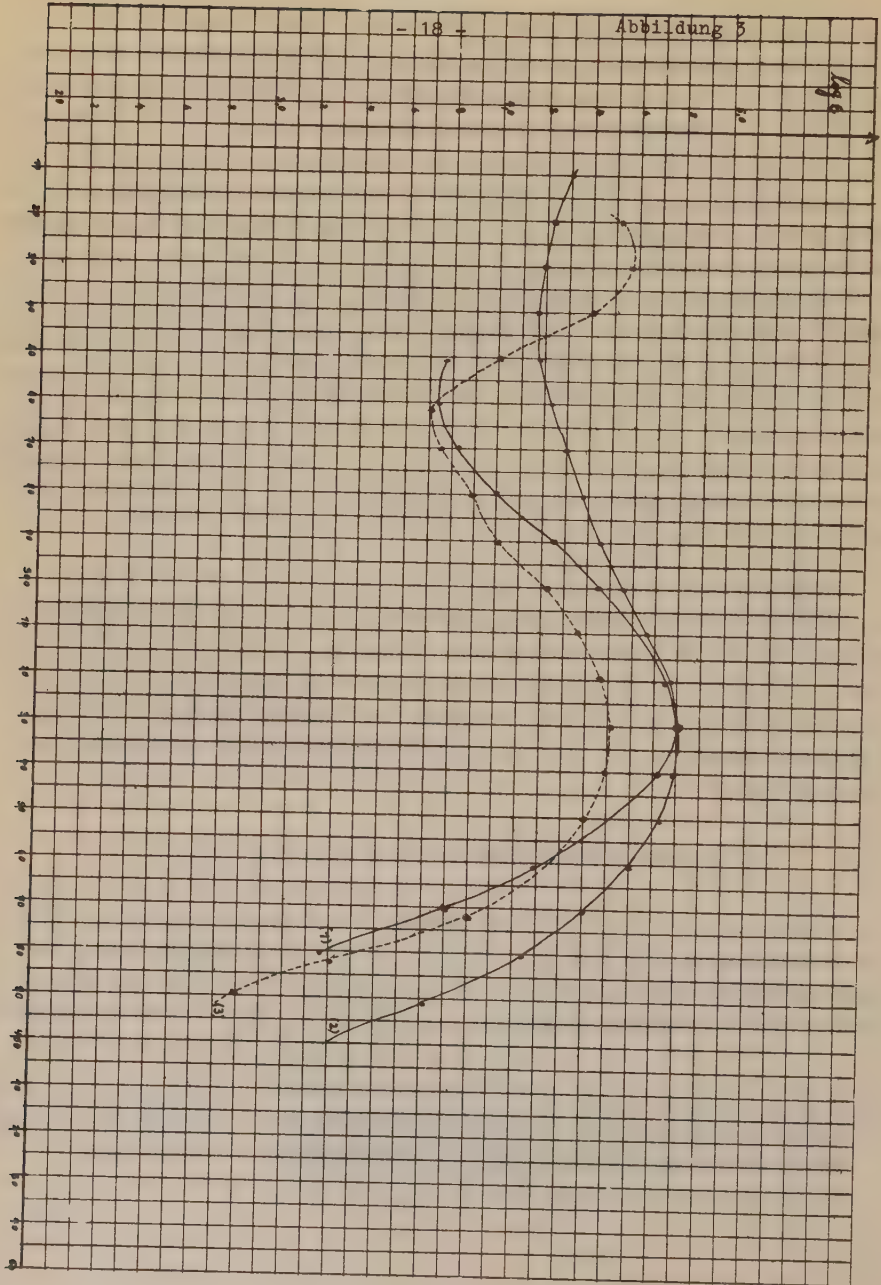
Wegen der sehr kleinen physiologischen Vitamin-A-Mengen im Blut ist zu erwarten, dass die Ausbeuten bei Veresterung nach der Extraktion aus Blutplasma unter die im Versuch mit reinem Vitamin-A ermittelten Werte absinken. Auch wird die Bestimmung durch zwischengeschaltete Veresterung zeitraubend. Zieht man dagegen die Lichtempfindlichkeit des Vitamins zur Bestimmung des Untergrunds heran, so kann eine wesentliche Verringerung des Zeitaufwands erreicht werden.

b) Zerstörung des Vitamins-A durch ultraviolettes Licht.

Vitamin-A wird durch Licht rasch zerstört, wobei längerwelliges Ultraviolett am wirksamsten ist (31). Von verschiedenen Autoren wurde vorgeschlagen, aus der Extinktionsdifferenz bei 324 μ vor und nach einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht den Vitamin-A-Gehalt zu bestimmen (31, 32).

[†]) 30) A. BUTENANDT NOVA ACTA LEOPOLDINA N.F., 1955 17, No.122 pp 445
31) B. DEMAREST Z. VITAMINF. 9, 20 (1939)
32) O. A. BESSEY J. BIOL. CHEM. 166, 177 (1946)

Abbildung 5

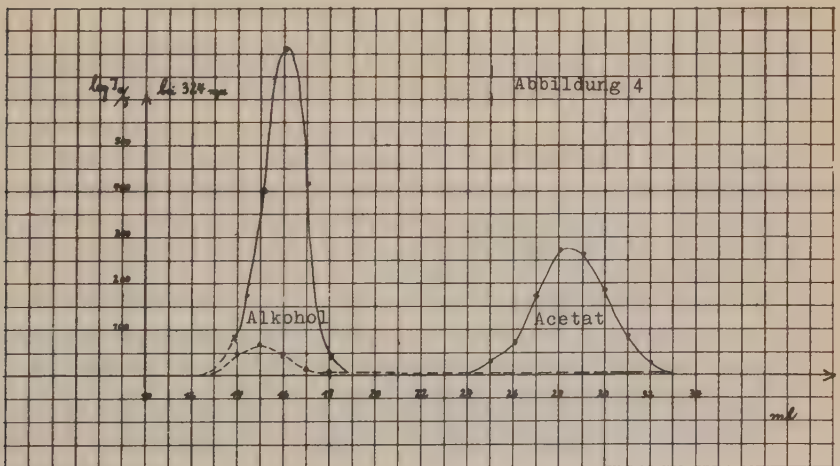


Reiner Vitamin-A-Alkohol und seine Ester werden bis zu 6 Stunden mit polychromem U. V. -Licht bestrahlt. Es wird gefunden, dass die Extinktion bei 324 m μ nach vierstündiger Belichtung auf 3% des Ausgangswertes absinkt (Versuch 9 und Tabelle 14).

In ähnlicher Weise wird die Absolutmenge von Vitamin-A-Alkohol bestimmt: nach Extraktion, Chromatographie und spektrophotometrischer Messung werden die einzelnen Vitamin-A-Alkohol-Fractionen 4 Stunden lang belichtet und dann erneut spektrophotometriert. Man erkennt in Abbildung 4, dass nach der Belichtung am Anfang der Elutionskurve ein niederes Maximum verbleibt, das nicht dem des Vitamin-A-Alkohols entspricht. Die Extinktion der belichteten Vitamin-A-Acetat-Fractionen geht dagegen auf 0 zurück, entsprechend dem Befund, dass diese Fractionen alle zwischen 300 und 350 m μ ein Maximum zeigen.

Abbildung 4.

Chromatographische Trennung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat nach Extraktion aus Blutplasma mit anschliessender Belichtung der einzelnen Fractionen. Die durch eine ausgezogene Linie verbundenen Fractionen zeigen bei 324 m μ ein Absorptionsmaximum. Gestricheltes Kurvenstück kein Maximum bei 324 m μ . Punktierte Kurve nach Belichtung der Fractionen. Weitere Kurvenbilder s. exp. Teil, Versuch 9.



3.) Bestimmung der höheren Vitamin-A-Ester.

Das Lösungsmittelsystem zur Verteilungschromatographie wurde so gewählt, dass Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat in verhältnismässig kurzer Zeit von der Säule eluiert werden können. Das am Kopf der Säule zurückbleibende Vitamin-A-Palmitat kann aus der Differenz Gesamtvitamin-A und der Summe Vitamin-A-Alkohol + Vitamin-A-Acetat berechnet werden. Den Gesamtvitamingehalt kann man dadurch bestimmen, dass man das Vitamin-A-haltige Plasma hydrolysiert, den in Freiheit gesetzten Vitamin-A-Alkohol wie beschrieben extrahiert und zur Abtrennung von den übrigen unverseifbaren Lipiden chromatographiert.

Eine Methode wurde ausgearbeitet, die es erlaubt, die Vitamin-A-Ester ohne Verluste zu hydrolysieren [†]) (Versuch 10 und Tabelle 15). Die Summe von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat wird nach dem bereits beschriebenen Verfahren bestimmt.

[†]) U. SCHIEDT unveröffentlichte Versuche.

4.) Der Gang der Bestimmungsmethode:

a) Gewinnung des Plasmas:

8 ml Humanblut werden sofort nach der Entnahme aus der Cubitalvene mit 2 ml einer 3,8% Natriumcitratlösung gemischt und im Eisschrank bei + 4°C 1/2 Stunde lang abgekühlt. Anschliessend wird 10 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert und der Plasmaüberstand, der nicht haemolytisch sein darf, abgehebert.

b) Extraktion:

2 ml Plasma gibt man tropfenweise in ein 100 ml Schliffkölbchen (NS 29), das vorher mit 10 g geglühtem fein pulverisiertem Zinksulfat und 50 ml Methanol/Äther 1:5 gefüllt und im Eisbad gekühlt wurde. Man schüttelt den Inhalt des verschlossenen Kölbchens 10 min lang, lässt das Zinksulfat-Pulver absetzen und giesst den Überstand in einen Scheidetrichter. Dasselbe wird 2x mit je 50 ml Methanol/Äther wiederholt und die vereinigten Lösungen 2x mit je 10 ml dest. Wasser gewaschen. Anschliessend wird mit 10 g geglühtem Natriumsulfat wasserfrei gemacht, im Vakuum bei 35°C auf ein Drittel eingengt, 0,5 g hydrophobisierte Kieselgur zugegeben und im Rotationsverdampfer bei gleicher Temperatur zur Trockne gebracht (vgl. Versuch 4).

c) Chromatographie:

Der Trockenrückstand wird in 2 ml mobiler Phase aus dem Eluiergemisch Heptan/ 97% Methanol aufgenommen und auf eine Säule gegeben, die wie folgt vorbereitet wird:

5,5 g hydrophobisierte Kieselgur wird mit 6 ml stationärer Phase angeschlämmt und mit 20 ml mobiler Phase in Portionen in eine Chromatographiesäule von 0,9 cm Durchmesser und 42 cm Länge gespült (Säule aus Jenaer Glas mit Hahn und Fritte). Durch dauerndes Rühren mit einem Glasstab werden die Kieselgurpartikel gleichmässig verteilt. Nach einstündigem Durchwaschen ist die Säule gebrauchsfertig.

Nach 8-10 ml Vorlauf werden Fraktionen von je 2 ml in nummerierte 5 ml-Schliffkölbchen gefüllt, mit je 1 ml Äthanol versetzt und zwischen 300 und 350 mμ im Zeiss-U. V. -Spektralphotometer gegen Heptan/ 97% Methanol gemessen.

d) Zerstörung des Vitamins-A:

Nach der Messung wird jede einzelne Fraktion in das gleiche Messkölbchen zurückgeleert und verschlossen 4 Stunden lang mit polychromem U. V. -Licht bestrahlt. Nach erneuter Messung der Extinktionen kann aus der Differenz zwischen erster und zweiter Messung der Vitamin-A-Inhalt des Plasmas bestimmt werden.

5.) Nachweisempfindlichkeit der Bestimmungsmethode für Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte.

In der Literatur sind zahlreiche Werte für den Vitamin-A-Gehalt des menschlichen Blutes angegeben. Als untere Grenze gilt für gesunde Personen 25-55 μ g Gesamtvitamin-A/100 ml Blutplasma (33). S.BISAZ (34) gibt als untere Grenze für 22% der untersuchten Personen 60-95 μ g Gesamtvitamin-A/100 ml Blutplasma an. Seine Höchstwerte (bei 11% der Personen) liegen zwischen 90-127 μ g Gesamtvitamin-A/100 ml Plasma. Entsprechend diesen Daten sollte eine quantitative Bestimmungsmethode jeweils 25-50 μ g Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat zu erfassen gestatten.

Um die Mengen an Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat zu ermitteln, die man mit der entwickelten Methode noch quantitativ bestimmen kann, wurden Versuche mit Blutplasma ausgeführt, dem 16, 8, 4 und 0,5 μ g Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat zugesetzt waren. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, können mit der beschriebenen Bestimmungsmethode 0,5 μ g Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat aus dem Plasma zu 86 bzw. 89% zurückgewonnen werden. Die Methode erlaubt somit auch die quantitative Erfassung sehr kleiner Vitamin-A-Mengen in Blutplasma.

Für die Anwendung der ausgearbeiteten Bestimmungsmethode, die auf der Extraktion des Vitamin-A-Alkohols und des Vitamin-A-Acetats aus Plasma, der chromatographischen Trennung der beiden Komponenten und der U. V. -Beleuchtung der Fraktionen beruht, ist die Kenntnis der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte von Interesse. Aus der 6-maligen Ausführung der Bestimmung des Vitamin-A-Alkohol- und Vitamin-A-Acetat-Gehalts des Plasmas zwischen

33) TRAV. MEMBRES SOC. CHIM. BIOL. 23, 1203 (1941)

34) S. BISAZ SCHW. MED. WOCHENSCHRIFT 82, 692 (1952)

jeweils 16 und 0,5 γ ergibt sich kein Gang der Werte und der mittlere Fehler der Einzelmessung berechnet sich zu $\pm 5\%$ für beide Komponenten (Tabelle 3).

Tabelle 3
Nachweisempfindlichkeit der Bestimmungsmethode

		% Rückgewinnung	
eingesetzte Mengen		Vitamin-A-Alkohol	Vitamin-A-Acetat
16	γ	81	81
8	γ	83	83
8	γ	81	82
8	γ	92	76
4	γ	80	73
0,5	γ	86	89

M (arithm. Mittel)

$$= 84 \pm 4,5$$

M (arithm. Mittel)

$$= 81 \pm 5,6$$

Bei Ermittlung der Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode wurde die Beobachtung gemacht, dass die Ausbeute an Vitamin-A-Alkohol oder Vitamin-A-Acetat etwas von der verwendeten Plasmamenge abhängig ist. Sind die zu bestimmenden 0,5 γ Vitamin-A-Alkohol oder Vitamin-A-Acetat in 5 ml Plasma enthalten, so liegt die Ausbeute nach Extraktion und Chromatographie für beide gleichmässig bei 71-73%. Sind aber die 0,5 γ Vitamin-A in 2 ml Plasma enthalten, dann steigt die Ausbeute auf etwa 84% an. Diese Beobachtung wurde auch von andern Autoren gemacht (A. MEX priv. Mitteilung). Der Verlust wird wohl darauf zurückzuführen sein, dass in der grösseren Plasmamenge auch der Proteinniederschlag relativ grösser ist, wodurch bei gegebener Vitamin-A-Menge auch etwas grössere Verluste eintreten.

IV. Anwendungen der Bestimmungsmethode.

1.) Stabilität von Vitamin-A in Blutplasma.

Einige Autoren behaupten (32), dass Vitamin-A in Plasma mehrere Tage stabil bleibt, wenn es im Eisschrank bei + 4°C aufbewahrt wird. Bei Bestimmung des Vitamin-A-Alkohol-Gehalts im menschlichen Blut sofort nach der Entnahme und nach 24 stündigem Stehen im Kühlschrank werden die in Tabelle 4 angeführten Werte erhalten. Danach nimmt der Vitamin-A-Alkohol-Gehalt in Humanplasma auch bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei + 4°C innerhalb von 24 Stunden etwa auf die Hälfte ab (Tabelle 4).

Tabelle 4.

Vitamin-A-Alkohol-Gehalt menschlichen Bluts
sofort nach Entnahme und nach 24 stündiger
Aufbewahrung im Kühlschrank bei + 4°C. Das
Blut wurde nüchternen Versuchspersonen ent-
nommen.

Bestimmung	sofort nach Blutentnahme γ / 100 ml Plasma	nach 24 Stunden γ / 100 ml Plasma
1	40	20
2	50	20

Dieser Befund ist verständlich, da im Blut und im Plasma stets Sauerstoff enthalten ist, der das autoxydable Molekül des Vitamins-A zerstört. Zu den Gehaltsbestimmungen ist daher stets frisches Plasma sofort nach der Gewinnung zu verwenden.

2.) Einfluss der Haemolyse auf den Vitamin-A-Gehalt von Plasma.

Zur Bestimmung des Vitamin-A-Gehalts von Blut müssen die Erythrocyten entfernt werden. Dabei kann gelegentlich in mehr oder weniger grossem Umfang Haemolyse auftreten. Es interessiert deshalb die Frage, ob der Vitamin-A-Gehalt durch Haemolyse beeinflusst wird. Da bekannt ist, dass Fe^{++} -Ionen (5) Vitamin-A sehr rasch zerstören, ist zu vermuten, dass auch Haemolyse zu einer Senkung des Vitamin-A-Gehalts führt und damit zu niedrige Blutwerte vor-täuscht. Die beschriebene Bestimmungsmethode erlaubt eine experimentelle Klärung des Problems.

Leicht haemolytisches Blut wird zentrifugiert. Man setzt dem schwach rötlich gefärbten Plasma Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat in üblicher Weise zu, extrahiert und chromatographiert. Durch alle Fraktionen der Chromatographie treten bei 324 $\text{m}\mu$ stark absorbierende Verunreinigungen auf. Ausserdem werden, wie Tabelle 5 zeigt, bis zu 20% des Vitamin-A-Alkohols zerstört, während der Vitamin-A-Acetat-Gehalt unbeeinflusst bleibt.

Tabelle 5

Zerstörung des Vitamin-A-Alkohols
durch haemolytisches Plasma.

Ausbeuten in % nach Chromatographie

	haemolytisches Plasma	normales Plasma
Vitamin-A-Alkohol	49	73
Vitamin-A-Acetat	70	71

3.) Adsorption von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat an Blutzellen.

Die in der Literatur angegebenen Werte für den Gesamtvitamin-A-Gehalt des Blutes sind auffallend niedrig (vgl. S. 22). Andererseits ist es grundsätzlich nicht möglich, den Vitamin-A-Gehalt des Gesamtblutes zu bestimmen. Es ist daher das Problem zu klären, ob nicht ein gewisser Teil des im Vollblut vorhandenen Vitamins-A an den Erythrocyten adsorptiv gebunden und mit diesen bei der Gewinnung des Plasmas entfernt wird. Als Beitrag zur Klärung dieser Frage wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

Ganz frisches Blut (1/2 Stunde alt) wird zur Vermeidung von Haemolyse in Gelatineröhrchen zentrifugiert. Den Überstand reichert man mit Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat in üblicher Weise an. Plasma und Blutzellen werden danach wieder vereinigt und gut gemischt. Dann wird nochmals zentrifugiert und der Vitamin-A-Gehalt des Plasmas bestimmt (Versuch 11).

Tabelle 6.

Adsorption von Vitamin-A an Blutzellen.
Im Kontrollversuch wurde der Vitamin-A-Gehalt des angereicherten Plasmas in üblicher Weise bestimmt.

	Vitamin-A-Alkohol	Vitamin-A-Acetat
	‰	‰
1. Versuch	95	22
2. Versuch	71	30
3. Versuch	85	40
Kontrollversuch	73	72

Die in Tabelle 6 zusammengefassten Ergebnisse von 3 Versuchen zeigen, dass der Zusatz von Blutzellen den Gehalt des Plasmas an Vitamin-A-Alcohol innerhalb der Genauigkeit der Bestimmungsmethode nicht beeinflusst. Vitamin-A-Acetat dagegen wird stark vermindert. Es ist anzunehmen, dass das Vitamin-A-Acetat an der lipophilen Hülle (35) der Erythrocyten adsorbiert wird. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass das wasserlösliche Vitamin-C an Leukocyten adsorbiert wird, wie LOWRY u. Mitarbeiter (36) fanden.

Ob die Adsorption von Vitamin-A-Acetat an Erythrocyten auch in vivo eine Rolle spielt, lässt sich beim derzeitigen Stand der Methodik nicht ohne weiteres entscheiden. Die in vitro-Versuche weisen auf diese Möglichkeit hin.

4.) Belastungsversuche mit Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat.

Die in den vorausgehenden Abschnitten beschriebene Bestimmungsmethode lässt sich nun auch zur Entscheidung der Frage heranziehen, in welcher Form per os appliziertes Vitamin-A-Acetat oder Vitamin-A-Palmitat im Blut auftritt. Zu diesem Zweck wurde der Vitamin-A-Spiegel von 2 gesunden männlichen Versuchspersonen vor und nach Belastung mit Vitamin-A-Estern bestimmt. Um die Ergebnisse mit Angaben der Literatur vergleichen zu können, wurden die gleichen Vitamin-A-Mengen verabreicht, die auch S. BISAZ (34) bei Belastungsversuchen gegeben hat. Da man nach Literaturangaben (37, 38) 3 Stunden nach Verabreichung mit einem Maximum der Vitamin-A-Werte im Plasma zu rechnen hat, wurde das Blut nach diesem Zeitintervall entnommen und die Bestimmung ausgeführt. Das Ergebnis der Belastungsversuche ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Besonders auffallend ist, dass Vitamin-A-Acetat auch bei per os-Gaben von 100 mg nicht im Blut nachgewiesen werden kann. Dieser Befund lässt sich auf verschiedene Weise interpretieren.

35) H. REIN PHYSIOLOGIE DES MENSCHEN 11. Auflage Springer-Verlag
Berlin 1955 Seite 23

36) O. H. LOWRY, J. A. LOPEZ u. O. A. BESSEY J. Biol. CHEM. 160, 609 (1945)

37) S. W. CLAUSEN, J. AMER. MED. ASSOC. 101, 1384 (1933)

38) R. J. SHAW u. H. J. DEUEL Jr. J. NUTRIT. 27, 395 (1944)

Tabelle 7.

Belastungsversuche beim Menschen mit oralen Gaben von Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat. Zeitintervall zwischen Verabreichung und Blutentnahme 3 Stunden. Als Kontrolle wurde für beide Personen der Nüchternwert des Vitamins bestimmt.

Versuchs- Nr.	Gaben	Diät	Vit. -A- Alkohol	Vit. -A- Acetat	Vit. -A-Palmitat + Carotin
				γ / 100 ml Plasma	

Versuchsperson N

1	-	-	13	0	nicht bestimmt
2	50 mg (Vit. -A-Ac.)	+ H ₂ O	12,5	0	nicht bestimmt

Versuchsperson A

1	-	-	20	0	nicht bestimmt
2	100 mg (Vit. -A-Ac.)	4 Butter- brote	40	0	nicht bestimmt
3	100 mg (Vit. -A-Palm.)	4 Honig- brote	25	0	55

Wie schon auf Seite 27 erwähnt, kann Vitamin-A-Acetat nie im Blutplasma nachgewiesen werden. Entweder gelangt das verabreichte Vitamin-A-Acetat nur als Vitamin-A-Alkohol zur Resorption, oder das resorbierte Vitamin-A-Acetat wird unter Umgehung der peripheren Blutbahn sofort in einem Depot, z.B. der Leber gestapelt. In Tabelle 7 fällt weiter auf, dass Gaben von 50 mg Vitamin-A-Acetat oder von 100 mg Vitamin-A-Palmitat zu keiner Erhöhung des Vitamin-A-Alkohol-Spiegels gegenüber den Kontrollen führt. Wird jedoch gleichzeitig mit der Vitamin-A-Acetat-Gabe fettreiche Nahrung verabfolgt, so kann eine Zunahme des Plasmaspiegels des Vitamin-A-Alkohols um 50% beachtet werden. Die gleiche Menge Vitamin-A-Palmitat ohne Fett gegeben vermag den Vitamin-A-Alkohol-Spiegel nicht signifikant anzuheben.

Verglichen mit der verabreichten Menge an Vitamin-A-Acetat ist die Zunahme (Versuchsperson A Versuch 2) des Vitamin-A-Alkoholspiegels im Plasma ausserordentlich gering: Es erscheint nur 1/2 % im Plasma. Auch dieser Befund kann dahingehend gedeutet werden, dass das verabreichte Vitamin-A-Acetat einem Depot zugeführt wird, von dem es erst langsam wieder an den Kreislauf abgegeben wird. Die Befunde könnten aber auch auf eine sehr geringe Ausnutzung des verabreichten Vitamin-A-Präparats hinweisen.

Die in Tabelle 7 zusammengefassten Versuche sollen lediglich die Brauchbarkeit der Bestimmungsmethode demonstrieren, deren Anwendung erst eine Beantwortung der aufgeworfenen Fragen ermöglicht.

V. Versuche.

Allgemeines.

Die Analysen wurden vom

Mikroanalytischen Laboratorium Alfred Bernhardt im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung

und

Mikroanalytischen Laboratorium Dr. A. Schoeller, Kronach/Oberfranken ausgeführt.

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Reiner kristallisierter Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Ester wurden dankenswerter Weise von der Deutschen Hoffmann-La Roche G. m. b. H. Grenzach/Baden zur Verfügung gestellt, ebenso die Vitamin-A-Präparate Arovit-Dragees und Arovit-Tropfen.

Die Messungen im Ultraviolett wurden mit dem

Zeiss-U. V. -Spektralphotometer P M Q II

die im Infrarot mit dem

Perkin-Elmer Doppelstrahl-Infrarot-Spektrographen Modell 21 durchgeführt.

Rinderblut.

Blutflaschen von 500 ml Inhalt werden mit 100 ml einer 3,8% Natriumcitratlösung gefüllt und im Autoklaven sterilisiert. Um Haemolyse zu vermeiden, muss vor der Blutabnahme wiederholt geschüttelt werden, damit ein geschlossener Flüssigkeitsfilm die Flascheninnenseite bedeckt. Nach der Abnahme müssen Blut und Natriumcitratlösung sofort gut gemischt werden. Man lässt im Kühlschrank bei +4°C oder besser im Tiefkühlraum bei -2°C kalt werden. Nach 1 Stunde kann mit der Bestimmung begonnen werden.

Humanblut.

Mit einer sterilen 10 ml Injektionsspritze (Kanüle 2) werden 2 ml einer 3,8% Natriumcitratlösung aufgezogen und anschliessend aus der Cubitalvene 8 ml Blut entnommen. Der Spritzeninhalt wird gut gemischt, auf Kühlschranktemperatur (+ 4°C) gebracht und dann 10 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert.

Versuch 1.

Einbringen von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Estern in Blutplasma.

Frisches Rinderblut wird 10 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert. Zu 5 ml Plasma, die sich in einem Schälchen von 3 cm Durchmesser befinden, gibt man tropfenweise und unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer (3 U/min) 0,5 ml einer ätherischen Vitamin-A-Lösung, die 12 $\frac{1}{100}$ ml Vitamin-A-Alkohol oder Vitamin-A-Ester enthält. Dann wird die Oberfläche mit einem Stickstoffstrom, der mit einem Überdruck von 4 mm Wassersäule aus einer Öffnung von 4 mm lichter Weite strömt, 20 min lang gespült. Gleichzeitig wird das Plasma gerührt. Man entnimmt dann 1 ml Plasma, verdünnt mit 2 ml Tyrodelösung, zentrifugiert erneut 10 min lang bei 2500 U/min und misst die Extinktionen zwischen 300 und 350 μ . Den Plasmaleerwert bestimmt man nach Verdünnen von 1 ml Plasma mit 2 ml Tyrodelösung und 10 min Zentrifugieren bei 2500 U/min (Ergebnisse Tabelle 8).

Tabelle 8.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse von Versuchen, die mit gleichen Mengen Vitamin-A-Alkohol und demselben Plasma gewonnen wurden (vgl. auch die Ergebnisse Seite 7)

V e r s u c h e

	1	2	3	4	5
% des in ätherischer Lösg. zugefügten Vit. -A-Alkohols	83	84	85	83	84

Versuch 2.

Versuch der Denaturierung von Vitamin-A-haltigem Plasma mit wasserfreien Metallsalzen.

Untersucht wurde die Wirkung von $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, HgSO_4 und $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Die Salze wurden vor der Verwendung sorgfältig gegläht und fein zermahlen.

Folgende Versuchsanordnung wurde eingehalten, um zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen:

10 g des wasserfreien Salzes werden in einem 100 ml Schliffkölbchen (NS 29) mit 50 ml Methanol/Äther 1:4 überschichtet und mit Eiswasser gekühlt. Man gibt 5 ml Vitamin-A-haltiges Plasma (je 10 μ /ml Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Stearat) unter Umschwenken tropfenweise zu und rührt so lange, bis der zunächst zähe, halb flüssige Bodenkörper pulvrig erscheint. Der Bodenkörper wird noch 2 x mit je 50 ml Methanol/Äther 1:4 digeriert und die Extraktionslösungen in einem Scheidetrichter vereinigt. Man wäscht 2x mit je 10 ml dest. Wasser, trocknet anschliessend mit 10 g geglähtem Natriumsulfat und bringt im Vakuum zur Trockne. Der Trockenrückstand wird in 3 ml Äthanol aufgenommen und zwischen 300 und 350 m gemessen (Ergebnisse s. Tabelle 1).

Versuch 3.

Variationen der Versuchsbedingungen.

a) Änderungen der Lösungsmittelzusammensetzung:

Erhöht man unter sonst gleichen Bedingungen den Anteil von Methanol am Extraktionsmittel, so wird vermehrt Protein extrahiert. Höhere Vitamin-A-Gehalte werden dadurch aber nicht erzielt.

b) Extraktion von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Estern aus Plasma ohne Eiskühlung:

Wie Tabelle 9 zeigt, wird durch Extraktion ohne Eiskühlung vermehrt Protein aus Plasma extrahiert, ohne dass eine Erhöhung der Vitamin-A-Ausbeuten eintritt.

Tabelle 9.

Plasmaextraktionen von Vitamin-A-
Alkohol. Denaturierung mit Zinksulfat
ohne Eiskühlung.

Höhe der Extinktion			Vergleich U. V. -Belichtung			
Extinkt.	nach Extr.	nach. Bel.	Differenz	reines Vit.	% vor	% nach
324 m	636	226	410	492	130	84
	553	175	378	430	129	88
	571	171	400	430	133	93
	650	261	389	430	150	90

c) Ausschütteln der Extraktionslösung mit wechselnden Mengen
dest. Wassers:

Werden die vereinigten Extraktionslösungen statt 2 x mit je 10 ml dest. Wasser gar nicht gewaschen, sondern sofort im Vakuum eingedampft, so erhöht sich der Plasmaleerwert ohne Erhöhung des extrahierten Vitamin-A. Wiederholtes Waschen mit grösseren Mengen Wasser bringt keine Verbesserung (Abbildung 5).

Abbildung 5.

Abhängigkeit der Vitamin-A-Ausbeuten
von den Extraktionsbedingungen.

- 1 Kontrolle: 10 g Vitamin-A-Alkohol
+ 10 g Vitamin-A-Acetat
gelöst in Äthanol
- 2-Extraktionen derselben Vitamin-A-Mengen
wie bei der Kontrolle aus Plasma
- 2 mit peroxydhaltigem Äther, Extrakt nicht
mit Wasser gewaschen
- 3 mit peroxydfreiem Äther, Extrakt nicht
mit Wasser gewaschen
- 4 mit peroxydfreiem Äther, Extrakt 2x
mit je 10 ml dest. Wasser gewaschen
- 5 mit peroxydfreiem Äther, Extrakt 4x
mit je 20 ml dest. Wasser gewaschen

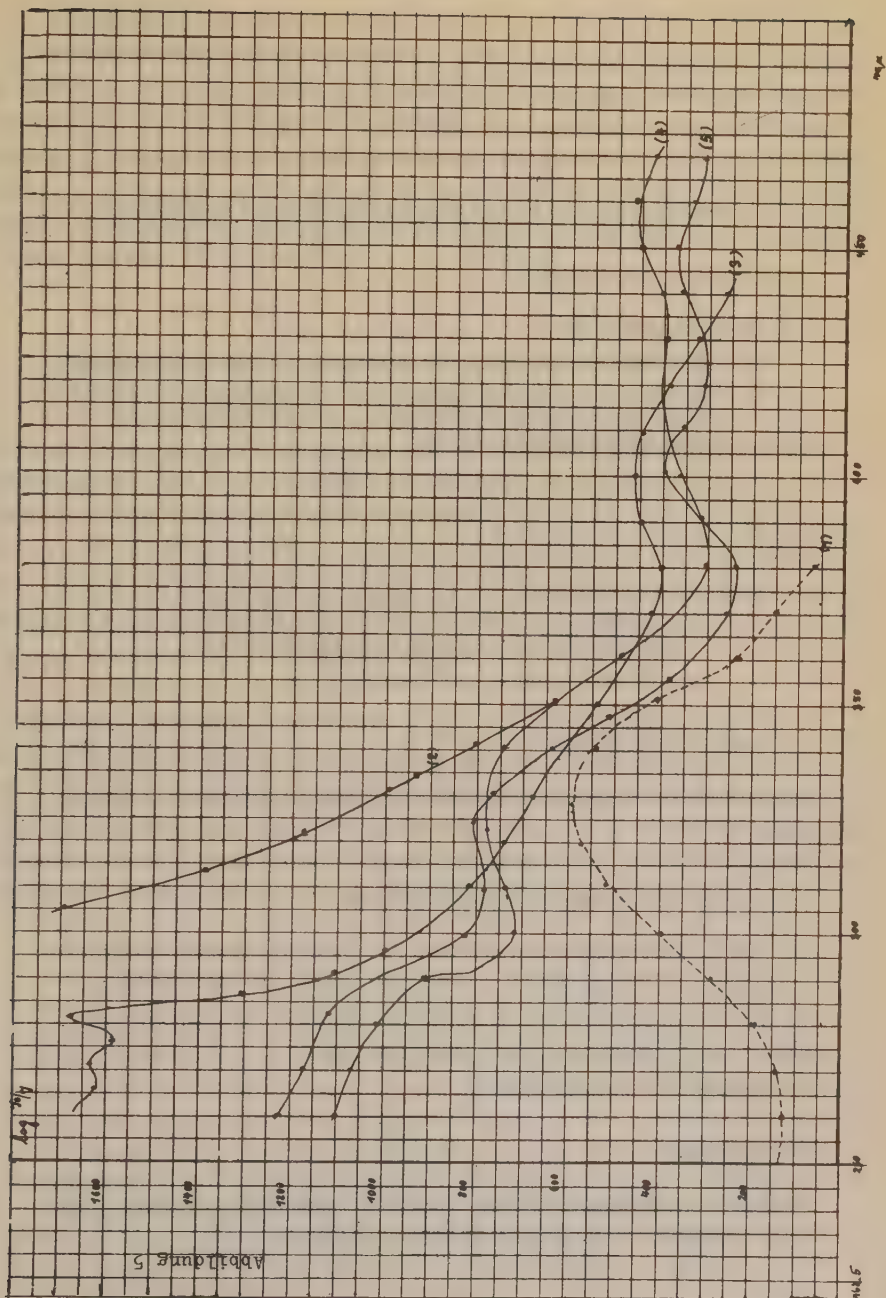
d) Einfluss von Temperaturschwankungen während des Eindampfens der Extrakte:

Die Variation der Versuchsbedingungen beim Eindampfen der Extrakte führt zu Schwankungen der Vitamin-A-Ausbeuten. Reproduzierbare Ergebnisse werden erhalten, wenn der Extrakt im Rotationsverdampfer bei nicht mehr als 35°C zur Trockne gebracht wird.

Versuch 4.

Extraktion von Vitamin-A-Alkohol
und Vitamin-A-Estern aus Blutplasma
(endgültige Form).

In einem 100 ml Schliffkölbchen (NS 29) werden 10 g fein pulverisiertes geglähtes Zinksulfat mit 50 ml Methanol / Äther 1:5 überschichtet, gut vorgekühlt und 5 ml Vitamin-A-haltiges Plasma unter dauerndem Rühren zugegeben. Man belässt 10 min im Eisbad, schüttelt von Zeit zu Zeit und giesst dann den gelb gefärbten Überstand in einen Scheidetrichter. Das Zinksulfat wird noch 2x



mit je 50 ml Methanol/Äther geschüttelt und die vereinigten Lösungen 2x mit je 10 ml dest. Wasser gewaschen. Die Extraktionslösung wird 1 Stunde lang mit 10 g frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei 35°C auf ein Drittel eingengt. Zur restlichen Lösung gibt man 0,5 g hydrophobierte Kieselgur und bringt im Rotationsverdampfer bei 35°C zur Trockne.

Alle Arbeiten müssen in einem abgedunkelten Raum ausgeführt werden.

Mögliche Fehlerquellen:

1.) Peroxydhaltiger Äther:

Vor jeder Bestimmung muss der Äther mit KJ/Stärke auf Abwesenheit von Peroxyden geprüft werden (vgl. Abbildung 5, Kurve 2)

2.) Methanol muss spektralrein sein.

Versuch 5.

Chromatographische Trennung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat an hydrophober Kieselgur und Hostalen S.

a) An hydrophober Kieselgur:

Die zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittel müssen optisch rein sein.

1.) Heptan wird folgendermassen behandelt:

250 ml Heptan werden nacheinander in einem Scheidetrichter mit 50 ml H_2SO_4 , 2x100 ml H_2O , 100 ml 10% NaOH, 70 ml n- KMnO_4 , 30 ml 10% H_2SO_4 und 3 x 100 ml H_2O behandelt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Bei der folgenden Destillation wird nur die Fraktion, die bei 98°C siedet, aufgefangen und verwendet.

2.) Methanol:

Methanol muss wasserfrei sein. Schon Differenzen des Wassergehalts von $\pm 1\%$ verhindern eine saubere Chromatographie.

3.) CELITE 535:

Die Kieselgur wird im Trockenschrank 3 Stunden auf 110°C erhitzt und nach dem Abkühlen im Exsiccator über Dichlordimethylsilan gestellt. Celite wird locker aufgeschichtet und öfters mit einem Glasstab umgerührt. Nach 3 tägigem Stehen wird so lange mit Methanol gewaschen, bis das Eluat farblos ist und neutral reagiert. Nach 1 stündigem Trocknen im Trockenschrank bei 110°C werden kleine Portionen im Soxhlet mit Heptan/Methanol einen Tag lang extrahiert. Nach abermaligem Trocknen ist die Kieselgur gebrauchsfertig.

4.) Chromatographie:

Zur Chromatographie werden 5,5 g hydrophobisierte Kieselgur mit 6 ml Heptan aus dem Eluiergemisch Heptan / 97 % Methanol angeschlämmt und der dünnflüssige Brei mit 20 ml mobiler Phase in eine Säule von 0,9 cm Durchmesser und 42 cm Länge gespült; die Chromatographiersäule soll aus Jenaer Glas gefertigt und mit Hahn und Fritte ausgerüstet sein. Man sorgt durch Rühren mit einem Glasstab für gleichmässige Verteilung der Kieselgurpartikel. Nach ein-stündigem Durchwaschen kann das in der mobilen Phase gelöste Vitamin-A oder der Extrakt aus Blutplasma aufgegeben werden.

Nach 8-10 ml Vorlauf werden Fraktionen von 2 ml abgenommen, mit je 1 ml Äthanol versetzt und zwischen 300 und 350 m μ im Zeiss-U.V.-Spektralphotometer gegen reines Heptan / 97% Methanol in Quarzküvetten gemessen. Häufig sind die Fraktionen nach der Chromatographie schwach getrübt, was durch unvermeidliche Temperaturschwankungen verursacht wird. Diese Trübungen werden durch den Äthanol-Zusatz zu den einzelnen Fraktionen beseitigt.

Tabelle 10.

Rückgewinnung von Vitamin-A-Alkohol und
Vitamin-A-Acetat bei der Chromatographie.

	eingesetzt $\mathcal{J}$	erhalten $\mathcal{J}$	%
Vitamin-A-Alkohol	52, 1	49, 6	95
	63, 8	62, 1	97
	55, 4	54, 9	99
	59, 2	61, 4	104
	59, 2	60, 5	102
	55, 1	53, 5	97
Vitamin-A-Acetat	65, 8	60, 0	91
	63, 1	63, 4	100
	64, 3	64, 1	100
	64, 3	64, 3	100
	64, 3	65, 9	102

Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat werden nach der Chromatographie quantitativ zurückerhalten.

Tabelle 11.

Vergleich der Extinktionsverhältnisse des
Vitamin-A-Alkohols vor und nach der Chromatographie.

$$v_1 = \frac{\text{Optische Dichte 300 } \mu\text{u}}{\text{Optische Dichte 324 } \mu\text{u}} \quad v_2 = \frac{\text{Optische Dichte 310 } \mu\text{u}}{\text{Optische Dichte 324 } \mu\text{u}}$$

$$v_3 = \frac{\text{Optische Dichte } 350 \text{ m } \mu}{\text{Optische Dichte } 324 \text{ m } \mu}$$

v_1		v_2		v_3	
vor	nach	vor	nach	vor	nach
der Chromatographie					
0, 59	0, 60	0, 84	0, 85	0, 46	0, 46
	0, 59		0, 85		0, 47
	0, 63		0, 89		0, 49
	0, 62		0, 86		0, 49
	0, 61		0, 86		0, 48

Vitamin-A-Alkohol wird nach der Chromatographie unverändert zurückgehalten.

b) An Hostalen:

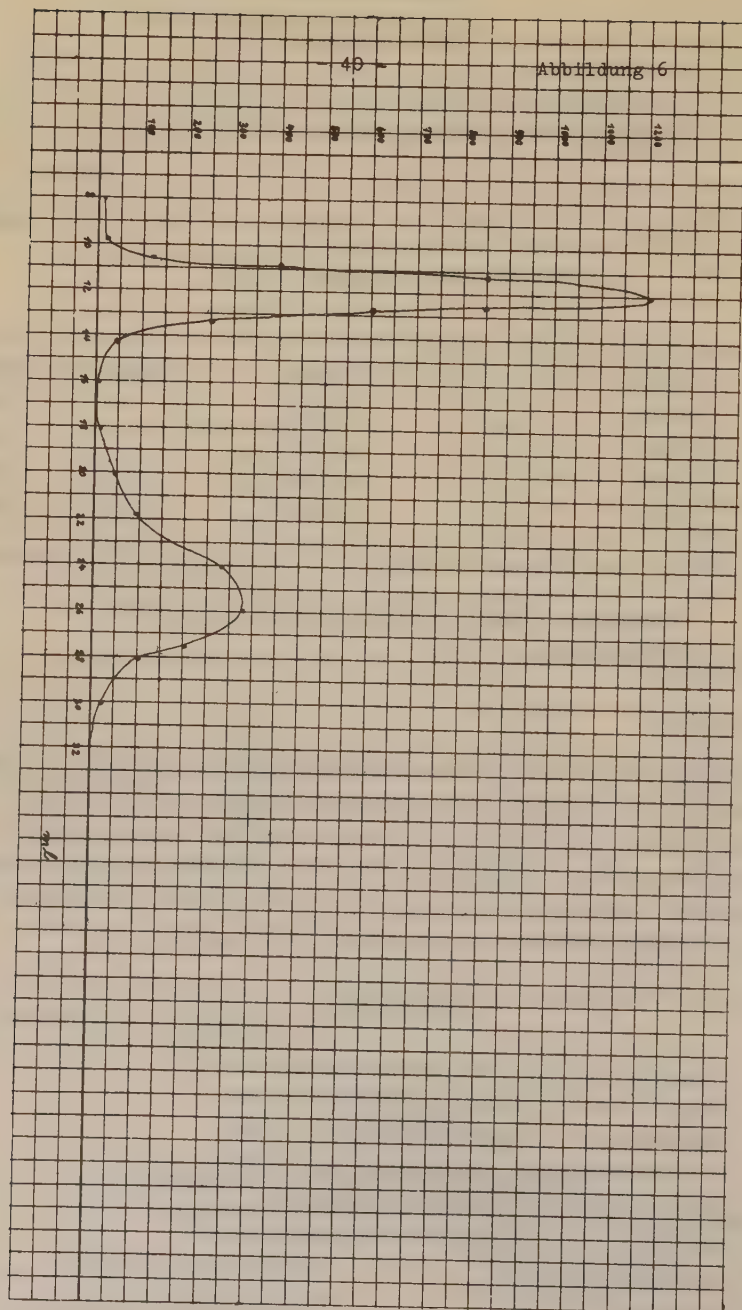
Als Trägermaterial für Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen wird in der Literatur Hostalen W angegeben (21) Versuche die Trennung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat an Hostalen S⁺) durchzuführen, gelangen mit dem dafür von WISS und GLOOR (21) beschriebenen Lösungsmittelsystemen nicht. Verwendet man dagegen zur Elution Heptan / 95% Methanol, so werden die beiden Verbindungen gut getrennt (Abbildung 6).

Abbildung 6.

Trennung von 15 γ Vitamin-A-Alkohol und 15 γ Vitamin-A-Acetat auf einer Säule aus Hostalen S mit Heptan / 95% Methanol. Das Gemisch wurde in 1 ml mobiler Phase auf die Säule gebracht. Die Säule wird durch Einschlämmen von 7 g Hostalen S in Lösungsmittel nach (21) hergestellt.

†)

Hostalen S wurde dankenswerter Weise von den Farbwerken Hoechst zur Verfügung gestellt.



Versuch 6.

Acetylierung von Vitamin-A-Alkohol.

25 g reiner Vitamin-A-Alkohol wird in einem 50 ml Schliffkölbchen mit 1 ml Acetanhydrid und 50 mg wasserfreiem Natriumacetat überschichtet, das Kölbchen mit Stickstoff gefüllt und 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Bei 35°C wird im Rotationsverdampfer abdestilliert, in 2 ml Heptan / 97 % Methanol aufgenommen und über eine Celite-Säule gegeben, um Verunreinigungen, die der Vitamin-A-Acetat-Bande vorauslaufen, abzutrennen.

Tabelle 12.

Acetylierung von Vitamin-A-Alkohol
mit Acetanhydrid.

Reaktionsdauer	Acetylierter Vit. -A-Alkohol
24 Stunden	49,5 %
48 Stunden	76,0 %

Versuch 7.

Veresterung von Vitamin-A-Alkohol
mit 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid.

1 m Mol des Säurechlorids wird in 9 ml wasserfreiem Benzol am Rückfluss gelöst. In ein zweites Kölbchen werden 0,5 m Mol des Vitamin-A-Alkohols eingewogen und mit dem gelösten Säurechlorid übergossen. Man lässt abkühlen, gibt 1 m Mol Pyridin zu und lässt 24 Stunden stehen. Am nächsten Tag wird der abgeschiedene rote Niederschlag abgesaugt und mit Benzol ausgewaschen, bis insgesamt 20 ml im Filtrat vorliegen. Dieses wird anschliessend 2x mit je 15 ml dest. Wasser geschüttelt mit Natriumsulfat getrocknet und im Umlaufverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Man lässt das Kölbchen so lange am Rotationsverdampfer, bis der Pyridingeruch verschwunden ist und nimmt dann in 9 ml Aceton auf. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aceton erhält man 162 mg = 60% des reinen Vitamin A-Esters (Schmpt. 142-143°C). Aus der Mutterlauge lassen sich weitere 27 mg = 10% mit dem Schmpt. 136°C gewinnen.

Molekular-Gewicht - $C_{33}H_{37}O_4N_3$ (539,7) $\lambda_{max} = 329 \text{ m } \mu$, $\epsilon_{max} = 65000$

Ber.	C 73,44	H 6,91	N 7,79
Gef.	C 73,17	H 6,71	N 7,81

(vgl. Abbildung 3).

Versuch 8.

Papierchromatographische Systeme für den
4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester
des Vitamin-A-Alkohols.

Papier der Fa. Schleicher-Schüll Nr. 2043 b wird durch Eintauchen in eine 0,3% Lösung von Stearato-chrom-3-chlorid in Aceton imprägniert und vor der Verwendung 10 min lang im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Als Reverenzsubstanzen wurde der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Octylalcohols, Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat aufgetragen.

Tabelle 13.

Papierchromatographische Systeme für den 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Vitamin-A-Alkohols. (Absteigendes Verfahren Stearato-chrom-3-chlorid-Imprägnierung).

Systeme	Laufzeit	R _f -Wert	Papier
Octan-Nitromethan	20 Stunden	läuft mit der Front	S.-S 2043 b
Decan-Nitromethan	5 "	bleibt am Start	"
" "	21 "	"	"
Heptan-Methanol	8 "	läuft mit der Front	"
Heptan-97% "	7 "	-	"
Octan-Metanol	5 "	"	"
Octan-97% Methanol	5 "	0,77	"

Nur das System 7 in Tabelle 13 liefert runde Flecken mit einem brauchbaren R_f-Wert.

Auch das System Pyridin/Decan 3:2⁺) wurde zur Chromatographie von Vitamin-A-Acetat, Vitamin-A-Palmitat und dem 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Vitamin-A-Alkohols auf acetyliertem Papier Schleicher-

⁺) D. STAMM DISSERTATION MÜNCHEN (1959).

Schüll Nr. 2043 b verwendet. Als Reverenzsubstanzen wurden ausserdem die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Methanols, Octanols und Decanols aufgetragen. Der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Vitamin-A-Alkohols (20-30 γ) wurde entweder in Benzol oder in Aceton gelöst auf das Papier gebracht. Überraschenderweise wanderte er immer mit der Front, wenn Benzol als Lösungsmittel verwendet wurde. Wird er aber in Aceton gelöst in Flecken von 1 cm Durchmesser aufgetragen, so quillt das Papier an der Auftragsstelle und verhindert eine zu rasche Lösung des Esters im System. Man erhält auf diese Weise annähernd runde Flecken mit einem R_f -Wert von 0,53 bei 6 Stunden Laufzeit.

Versuch 9.

Zerstörung des Vitamins-A durch ultraviolettes Licht.

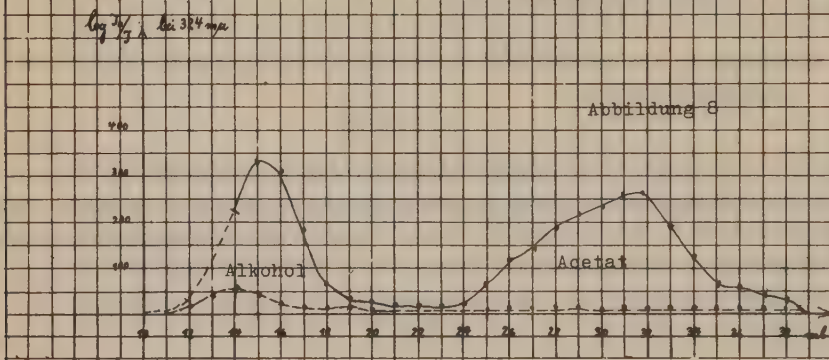
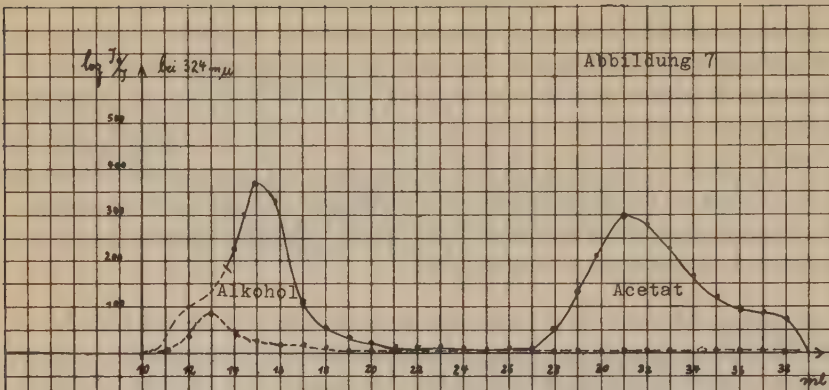
a) Bestrahlung von reinem Vitamin-A-Alkohol und seinen Estern mit ultraviolettem Licht.

Je 160 γ Vitamin-A-Alkohol, Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Stearat werden in 5 ml Äthanol gelöst und in verschlossenen Messkölbchen verschieden lange mit polychromem U. V. -Licht bestrahlt. Zum Vergleich werden dieselben Mengen in Äthanol gelöst und sofort gemessen. Es zeigt sich, dass die Extinktion bei 324 m nach 4 stündiger Bestrahlung auf 3 % des Ausgangswertes absinkt, wie Tabelle 14 erkennen lässt.

Tabelle 14.

Bestrahlung von reinem Vitamin-A-Alkohol, Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Stearat mit ultraviolettem Licht.

Belichtung Std.	Vit. -A-Alkohol % des Ausgangswertes	Vit. -A-Stearat	Vit. -A-Acetat
0	100	100	100
1	27	11	13
2	9	6	5
3	4	5	7
4	3	3	3
5	1	3	2
6	1	3	3



Abbildungen 7 und 8.

Weitere chromatographische Trennungen von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat nach Extraktion aus Blutplasma und anschließender Belichtung der Fraktionen (vgl. Legende der Abbildung 4).

- b) Bestrahlung von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat mit ultravioletterem Licht nach Extraktion aus Plasma und anschliessender Chromatographie.

Nach Extraktion und Chromatographie wie in Versuch 9 a beschrieben werden je 2 ml des Eluats in mit Glasstopfen verschliessbaren Messkölbchen aus Fensterglas aufgefangen, mit 1 ml Äthanol verdünnt und verschlossen 4 Stunden lang mit ultravioletterem Licht bestrahlt (Analysenlampe S 500 der Quarzlampengesellschaft Hanau). Die Abbildungen 4, 4 a und 4 b geben die Kurvenbilder wieder.

Die Extinktionen der beiden ersten Vitamin-A-Alkohol-Fractionen sind nach der Belichtung noch relativ hoch. Dies zeigt, daß sie durch mitlaufende Begleitsubstanzen verunreinigt sind. Die Verunreinigungen nehmen in den folgenden Fractionen rasch ab, um in der 2. Hälfte der Vitamin-A-Alkohol-Bande ganz zu verschwinden.

Versuch 10.

Bestimmung der höheren Vitamin-A-Ester.

Reines Vitamin-A-Acetat und reines Vitamin-A-Stearat werden in einem Gemisch aus 4 ml Methanol und 1 ml 60% Kalilauge in dicht verschlossenen, mit Stickstoff gefüllten Schliffkölbchen 1/2 Stunde lang auf 64°C erwärmt (Thermostat). Das mit 10 ml Wasser verdünnte Hydrolysat wird 2x mit je 6 ml Petroläther (K. P. 30-50°C) extrahiert. Die vereinigten Petrolätherphasen werden mit Wasser gewaschen und bei 40-50°C im Vakuum eingedampft.

In einer Reihe von Versuchen wurden bekannte Mengen von Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Stearat auf diese Weise verseift und die Hydrolysate anschliessend chromatographiert. Die Vitamin-A-Alkohol-Fractionen wurden aufgefangen und photometriert. Tabelle 15 gibt die Resultate.

Tabelle 15.

Nach Hydrolyse von Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Stearat chromatographisch erhaltener Vitamin-A-Alkohol.

Ester	eingesetzte Menge Mol	Vit. -A-Alkohol Mol	Ausbeute %
	0,1246	0,1160	93
Vit. -A-Stearat	0,1246	0,1205	97
	0,1246	0,1185	95
	0,1513	0,1450	96
Vit. -A-Acetat	0,1513	0,1504	99
	0,1513	0,1460	96

Die Extinktionsverhältnisse des durch Hydrolyse erhaltenen Vitamin-A-Alkohols sind praktisch identisch mit denjenigen von reinem kristallisiertem Vitamin-A-Alkohol. Bei der Hydrolyse und der nachfolgenden Chromatographie tritt keine Zersetzung ein.

Versuch 11.

Absorption von Vitamin-A-Alkohol und
Vitamin-A-Acetat an Blutzellen.

5 ml Blut werden in Gelatineröhrchen 15 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert. Dem Überstand (3 ml Plasma) fügt man je 15 μ l in Äther gelöstes Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Alkohol zu und dampft den Äther 10 min lang mit Stickstoff ab. Plasma und Blutzellen werden wieder vereinigt und 10 min lang gut gemischt. Dann wird nochmals 15 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert, 1 ml Plasma entnommen und wie beschrieben der Extraktion und Chromatographie unterworfen (Ergebnisse s. Tabelle 6).

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung physiologischer Mengen von Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Estern in Blutplasma beschrieben. Die Bestimmungsmethode beruht auf der Extraktion des Vitamins-A aus Blutplasma und der nachfolgenden Trennung der Komponenten durch Verteilungschromatographie. Das Verfahren erlaubt die quantitative und reproduzierbare Bestimmung von je 0,5 μ g Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat.

Unter Ausnützung der Lichtempfindlichkeit von Vitamin-A kann der Gehalt des Plasmas an Vitamin-A-Alkohol und Vitamin-A-Acetat mit einem mittleren Fehler von $\pm 5\%$ ermittelt werden. Die höheren Vitamin-A-Ester werden durch ein Differenzverfahren bestimmt.

Im Rahmen der Arbeit wird der bisher nicht beschriebene 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Vitamins-A dargestellt und durch seine physikalischen Daten sowie papierchromatographisch charakterisiert. Der Ester eignet sich zur Isolierung, Reindarstellung und Charakterisierung kleiner Mengen von Vitamin-A-Alkohol.

Durch Anwendung der Bestimmungsmethode wird die Stabilität von Vitamin-A in Blutplasma untersucht und im Gegensatz zu Literaturangaben eine Abnahme des Vitamin-A-Alkohol-Gehalts von Blutplasma innerhalb von 24 Stunden auf die Hälfte ermittelt. Weiter wird gezeigt, dass Vitamin-A-Alkohol durch haemolytisches Blut zerstört wird, während Vitamin-A-Acetat unbeeinflusst bleibt. In *in vitro*-Versuchen wird die Adsorption von Vitamin-A-Acetat an Erythrocyten festgestellt.

Belastungsversuche an Menschen mit handelsüblichen Vitamin-A-Esterpräparaten zeigen, dass Vitamin-A-Acetat auch nach sehr hohen Gaben (100 mg) nicht im Blut nachgewiesen werden kann. Gaben von Vitamin-A-Acetat oder Vitamin-A-Palmitat in alkoholischer wasserdispersibler Lösung führen zu keiner Erhöhung des Vitamin-A-Alkohol-Spiegels des Blutplasmas gegenüber den Kontrollen. Wird gleichzeitig mit Vitamin-A-Acetat fettreiche Nahrung verabfolgt, kann eine Erhöhung des Vitamin-A-Alkohols im Plasma festgestellt werden. Verglichen mit der verabreichten Menge ist die Zunahme (1/2 %) aber ausserordentlich gering.

Lebenslauf.

Ich wurde am 13. August 1930 in Stuttgart geboren. Meine Eltern Friedrich Aichele, Kassenleiter und Helene, geb. Graupner entstammen alteingesessenen schwäbischen Familien. 1938 trat ich in die Grundschule ein, 1942 in die Friedrich-Eugens-Oberrealschule in Stuttgart. Von 1943-1945 besuchte ich das Gymnasium in Biberach/Riss. Auf das Abitur 1951 folgten Praktikantenzeit in einer Apotheke und nach dem Vorexamen Studium der Pharmazie von 1953-56 bei Prof. W. Hückel an der Universität Tübingen. Nach dem Staatsexamen begann ich im Winter 1956/57 mit der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in München.

